

Publication 1

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-076592

(43)Date of publication of application : 15.03.1990

(51)Int.Cl.

C12P 7/56

(21)Application number : 01-184839

(71)Applicant : RHONE-POULENC CHIM

(22)Date of filing : 19.07.1989

(72)Inventor : SCHNEIDER DIDIER  
LAMONERIE HUBERT

(30)Priority

Priority number : 88 8810789

Priority date : 10.08.1988

Priority country : FR

## (54) PRODUCTION OF LACTIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable the hydrolysis of starch and at the same time the economical production of lactic acid by adding an amylose-hydrolyzing saccharifying enzyme into an aqueous nutrient medium containing starch as an assimilable carbon source and fermenting the mixture with microorganism.

CONSTITUTION: Drinking water is added to a starch such as wheat flour to prepare a suspension, and the suspension is liquefied by blowing steam into it. Subsequently, the resultant liquid is placed in a fermentation tank, and this is sterilized after adding a nitrogen source such as ammonium sulfate and other nutrients. Then, at least one of saccharifying enzymes such as glucoamylase is charged into the sterilized mixture to prepare a medium. Into the aqueous medium, a cultured body of *Lactobacillus lactis* ATCC 12314, which has been inoculated into a medium such as an MRS medium, is seeded, and the mixture is fermented to produce lactic acid. After the fermentation, the produced lactic acid is recovered from a fermentation tank, and it is purified by known methods such as filtration and solvent extraction. This process enables the production of lactic acid under the saving of time with the omission of a process, in which the starch is saccharified in advance, as well as at a low cost.

Pf 4314

[特許]2004-042464

[受付日]平成20.09.10

1/E

【書類名】 刊行物等提出書

【提出日】 平成20年 9月 8日

【あて先】 特許庁長官 鈴木 隆史 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2004- 42464

【出願公開番号】 特開2004-248673

【提出者】

【住所又は居所】 省略

【氏名又は名称】 省略

【提出する刊行物等】 刊行物1：特開平2-76592号（公開日：平成2（1990）年3月15日）

【提出の理由】

【提出物件の目録】

【物件名】 刊行物1：特開平2-76592号

写し 1

## 公知刊行物 /

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

## ⑫ 公開特許公報(A) 平2-76592

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)3月15日

C 12 P 7/58

6826-4B

審査請求 有 請求項の数 11 (全6頁)

## ⑮ 発明の名称 乳酸の製法

⑯ 特 願 平1-184839

【添付書類】

⑰ 出 願 平1(1989)7月19日

6  176

優先権主張 ⑱ 1988年8月10日 ⑲ フランス(FR) ⑳ 8810789

㉑ 発 明 者

ダイダイエ シュメダ フランス国、79500-メル、リュ エロワ リカ-

ール、7

㉒ 発 明 者

ウペール ラモーヌリ フランス国、79500-メル、リュ フコードリー(香  
地なし)

㉓ 出 願 人

ローヌーブラン シミ フランス国、92403-クループボワ、ケ ボール ド  
ウーメル、25

㉔ 代 理 人

弁理士 青木 朗 外4名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

乳酸の製法

## 2. 特許請求の範囲

1. 消化可能な炭素源として澱粉を含む水性炭素培地中の微生物を使用する菌叢による乳酸の製法であって、少なくとも1つのアミロース加水分解用酵素を付加的に存在させて発酵を行うことを特徴とする方法。

2. 澱粉を、消化したか、または部分的に消化した状態で使用する、請求項1記載の方法。

3. 澱粉を生産物の状態で使用する、請求項1記載の方法。

4. 菌叢培地が、糖化酵素に加えて炭化酵素を含む、請求項3記載の方法。

5. 澱粉が、菌叢培地に対するグルコースの濃度比が0.9-1.8%となるのに必要な量存在する、請求項1-4のいずれかに記載の方法。

6. 糖化酵素を、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、インアミラーゼ、プルラン-

ゼおよびこれらの混合物から選ぶ、請求項1-5のいずれかに記載の方法。

7. 糖化酵素を、乾燥状態で測定した澱粉1gに対して0.04-2酵素活性単位となるのに十分な量使用する、請求項1-6のいずれかに記載の方法。

8. 糖化酵素がグルコアミラーゼであり、かつ澱粉に含まれる固体の重量に対して0.02-1%である量を使用する、請求項1-7のいずれかに記載の方法。

9. 微生物を、*Lactobacillus*属、*Streptococcus*属、*Pedococcus*属、*Bacillus*属、および*Sporolactobacillus*属に属する微生物、ならびに*Rhizopus*属に属する菌叢から選ぶ、請求項1-8のいずれかに記載の方法。

10. 澱粉をpH3.0-8.0で行う、請求項1-9のいずれかに記載の方法。

11. pHを、アルカリ金属、アルカリ土類金属またはアンモニウムの水酸化物または炭酸塩から選ぶ添加剤によって制御する、請求項1-10記載の方

特開平 2-76592(2)

法。

## 3. 発酵の詳細な説明

本発明は微生物によって脱水化合物を調製させる乳製製造の改良方法に関する。さらに、特定すれば発酵から由来する糖類の結化による微生物学的方法に関する。

適切な微生物を存在させて、糖類を調製させる有機酸の合成は世界的に周知の方法である。このような微生物による調製で得られる典型的な酸としては、たとえば酢酸、乳酸、くえん酸、グルコン酸、2-ケトグルコン酸、フマル酸、およびイタコン酸がある。これらの酸は食品、医薬品、化学製品およびその他の工業で用いられる。その例にたとえば、J. Gutcho-Hoyes Data CorporationのChemicals by Fermentation, 1973 に記載されている。

工業的調製において、低質の脱水化合物は、使用の容易さ、価格および回収率を高める可能性を同時に考慮して選択する。酸粉は、容易に得られる脱水化合物として、しばしば考慮された。しかし、すべ

ての微生物は、大部分がデキストロースを代謝するのには、酸粉を代謝することができない。その結果、酸粉は通常糖類に加水分解して結化しなければならぬので、製造装置を高めている。

本発明の主要な目的は、栄養源として酸粉を使用し、グルコースまたはグルコース含有の安い酸粉の加水分解生成物の収率と少なくとも等しい収率で、経済的に調製させる方法を提案することである。

微生物を使用して、酸粉を酵素的に加水分解すると同時に、酸粉を合成できることを発見した。これによって、酸粉を予め結化する工程の省略による時間の節約の他に、調製条件のpHおよび温度が、加水分解酵素の最適活性条件と異なっている、酸の生成速度がグルコースを基質とする場合に比べて顕著な差がないことは予想外なことであった。

本発明による、発酵できる底質源として酸粉を含む水性栄養液を微生物によって調製させる乳製製造法は、少なくとも1つのアミノ酸加水分解

(3)

解酸化酵素を加えて、発酵させる。

本発明によって栄養源として使用する酸粉は、小麥、トウモロコシ、高粱、米、タピオカ、糠、燕麥のような穀類の酸粉、または馬鈴薯のような根菜の酸粉でもよい。酸粉は生酸粉のままか、または結化したか、または特に結化した形で使用する。

本発明書において、用語「酸粉」は、生酸粉の水性懸濁液、酸粉の不完全な加水分解生成物、たとえば炭水化合物（炭水化合物）した酸粉、酸粉のシロップ、およびデキストロースを含む加水分解生成物を含む。酸粉の加水分解生成物は、加水分解の程度によって多岐であり、この程度はデキストロース当量、B.E.およびオリゴサッカライドおよびさらに高糖オリゴサッカライドのデキストロース含量で表される。炭水化合物酸粉はB.E.約3-20を示し、一般にオリゴサッカライド50-95%を含む。酸粉度がグリコース単位G7を超える。酸粉のシロップ、またはデキストロース含量の低いグルコースのシロップは、B.E.が約20-88を示し、G7を超える

(4)

オリゴサッカライドが10-50%である。酸粉の加水分解生成物またはデキストロースを含むシロップは、B.E.が90-98%に達する。酸粉の加水分解生成物の製造は、酸粉でよく知られている。通常炭水化合物および酸粉シロップは、酸化のロアミラーゼ、時にはβ-ミラーゼによって酸性加水分解および/または酵素加水分解によって得られる。

グルコースを含む加水分解生成物を得るには、2工程による酸粉の炭化、すなわち炭化のロアミラーゼの作用、次に糖化酵素たとえばα-グルコシダーゼの名でも知られているグルコアミラーゼの作用によることがもっとも多い。

本発明の方法の実施において、酸粉シロップ、特に炭化された酸粉を使用することが好ましいグルコースを含む加水分解生成物の使用は、経済的見地から有利でない、それはα-グルコシダーゼの最適活性条件の50℃を超える温度、およびpH 4.5-5.5においてさえ、長時間を要する予備糖化工程を含むからである。

酸粉およびその加水分解生成物は、結晶しない

(5)

(6)

## 特開平 2-75592(3)

ます、滅菌した後に、本発明の方法に直接使用することができる。また精製され、濃縮または粉末とした市販の製品、たとえばマルトデキストリンも使用できる。

最粉は、固形物中では、グルコース当量固形物の質量比が約0.8〜18%となるように存在させる。生粉物は、乾燥状態として、固形物に対して約10〜200 g/ノ、好ましくは50〜150 g/ノとする。

本発明によって、イタコン酸生産菌を含む固形物地に加える、アミロース分解酵素は、最粉のデキストリンをグルコースおよびマルトースに実施することができる。糖化酵素として糖化ロアミラーゼたとえば*Bacillus subtilis* var. *amylolaccarientis*、酸性アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、イソアミラーゼ、グルララーゼを挙げることができる。これらの酵素は湿粉または湿粉として使用することができる。

グルコアミラーゼは活性が保たれているので好ましい。グルコアミラーゼはすべての活性グルコ

イラーゼ、たとえば*Aspergillus*, *Endomycus* または *Rhizopus* とすることができる。[産業用として特許]に生粉物を使用する場合は、糖化酵素、たとえば糖化ロアミラーゼと $\beta$ -アミラーゼ、または糖化ロアミラーゼとグルコアミラーゼの混合物に加えて糖化酵素を使用することができる。[産業の工学的な製造方法は *Encycl. of Pol. Sc. Vol. 5*, p46-53 に記載されている。

アミロース加水分解糖化酵素、糖化酵素であってもよいが、これを最粉の糖化、または糖化に必要な量として固形物地に加える。最少使用量は酵素の活性度、堆積中に存在する最粉の0.8、0.8の糖化であり、熟成量によって容易に決定することができる。一般的には、乾燥状態で測定した最粉1gに対して、酵素活性度0.04〜2単位、好ましくは0.1〜1単位を与えるのに十分な量を使用する。糖化酵素として *Novo Industry* が市販する発酵製品名 *AMG 200L* グルコアミラーゼは、固形物堆積中に存在する糖化された最粉に含まれる固体の重量にもとづいて、0.02〜1%、好ましくは0.05〜

(1)

(2)

0.5%を加えることができる。

本発明の方法は、結の存在においてD-またはL-乳酸を生成できれば、どのような微生物でも使用することができる。特に *Lactobacillus* 属たとえば *delbreckii*, *L. lactis*, *L. Leichmannii*, *L. bulgaricus*, *L. jurgens*, *L. casei*, *L. hilalicus*, *L. plantarum* ; および *Streptococcus* 属たとえば *S. thermophilus*, *S. faecium* ; および *Pediococcus* 属たとえば *P. pentosaceus*、ならびに *Bacillus* 属、*Sporolactobacillus* 属および真菌たとえば *Rhizopus orizae* を挙げることができる。

本発明で使用するアミロース分解酵素および炭素源の他に、製造地および菌種を文獻の記載から選ぶことができる。便宜の製造地はたとえば *ICI Chemicals by Fermentation* の他、多くの特許たとえば米国特許A-3 125 454、フランス特許A-1 355 547、欧州特許A-69 291、欧州特許A-12 010、欧州特許A-113 215、本国特許A-4 584 554 に記載されている。

炭素源は、同化可能な無機炭および有機化合物、

たとえば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、りん酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、トウモロコシ(C5L)および/または大豆の可溶性抽出物、炭素、ビール酵母、ペプトン、魚たんぱく分解生成物などおよびこれらの混合物を使用することができる。塩基は、無機塩類たとえばCa、Mg、Na、K、Fe、Ni、Co、Cu、Mn、Znの硫酸塩、塩化物、りん酸塩、の他に、ビタミン、または炭素の添加物、たとえば亜硝酸ナトリウムまたは炭酸ナトリウムを含むことができる。

微生物は、同様にように媒体または中間媒体として固形物堆積中に導入する。

アミロース分解酵素は、接種直前に滅菌した堆積地に加えることができる。菌種はpH約3.0〜8.0、好ましくは5.0〜7.0、温度約20〜50℃として適宜行うが、最適条件は使用する微生物の特性は菌株によって変わる。*Lactobacillus lactis* を使用すると、pH5.5〜6.0、温度約35〜45℃で乳酸の収率を上げることができる。炭素源のpHを調節する中和剤は、アルカリ金属の水酸化物または

(3)

(10)

## 特開平 2-76592(4)

炭酸塩、アルカリ土類金属のアンモニウム塩から選り、溶解の前、または溶解の全工程において、連続的にまたは不連続的に導入することができる。

溶解させた後、生成した乳剤を溶解槽から回収し、固相の方法、たとえば濾過、蒸発、結晶化、または溶媒抽出によって分離することができる。

下記の説明は、原料から由来する炭水化物を含む増地、原料またはその加水分解生成物であるモノまたはポリサッカライドを加水分解することができる酵素を存在させて、微生物によって分解させて乳剤を製造する特殊な方法を要するものであるが、本発明の増地製造の正確な組成または特殊な製造方法を限定するものではない。

次の実施例によって本発明を例示する。

## 例 1

## (a) 原料として用いた生菌の製造

酵母5gの増地槽に、小麥粉(815 800UTS) 8.75kgを導入した。飲料水を攪拌しながら加えて全固体を20g/lの懸濁液とした。懸濁液は35.0でpHを6.5に調整し、熱安定性αアミラーゼ(登録

商標 TERNANT 120L-RVD Industry)を含む増地(固形物3.65wt%)を20分間攪拌を停止して温度100℃で増地懸濁液を滅菌化した後、増地温度に冷却した。

## (b) 増地

滅菌化した増地を含む増地槽に、濃縮トウモロコシ(CS)の浸漬水 1.750kg、魚たんぱく加水分解生成物 0.270kg、りん酸15mlを導入した。混合時に飲料水を加えて27g/lとした。この増地を攪拌し、34.0でpHを5.0に調整し、1時間間隔を収めて100℃で滅菌した。

増地の滅菌後、濃縮カルシウム4.2kgを飲料水12gに溶解した。この増地に原料を1時間30分攪拌して攪拌し、冷却した後、増地槽に連続攪拌で移した。温度を40℃に調整した。グルコアミラーゼ(登録商標AG 200L-RVD Industry)を含む増地(固形物3.65wt%)を導入した。この増地に、予め増地MRS(Millieu de Rén, Rogosa et Sharpe - 参照番号0881-01 de OTCO)に接種したLactobacillus lactis ATCC 12314の増地1.7gを導入し、

(11)

(12)

した。増地槽は、最終的に50g/lとし、40℃の滅菌室の雰囲気中で攪拌し、滅菌した。増地は45時間培養した。

D-乳酸 123.3gを添加、生産性は2.74g/g/hであった。

## 比較例 2-4

例1(b)に記載するように、同一のLactobacillus lactis ATCC 12314増地槽を使用した。グルコアミラーゼを存在させずに、一連の増地を行った。増地は下記のように構成した。グルコース-水和物6.50kg(例2)、脱加水分解生成物 8.150kg(815 800UTS市販のT4986)、乾燥状態の食品79%、D.E.約66-80(例3)、例1記載の条件で滅菌した生菌6.75kg(例4)。

各例において増地槽の最終体積は50g/lとした。増地時間および生産性を表1に示す。

各例1-4の工程において、増地槽の試料を定期的に採取して、増地液体プロファイルによって乳酸の量を測定した。その結果を表1のグラフに示す。曲線1-4は、増地槽中のg

(13)

(14)

g/で表わした乳酸の生産量を、増地時間(h)で表わした増地の速度として各例1-4について示す。

## 例 5-6

下記条件が異なる例は、例1と同一の培養槽を使用して例1と同一の条件で2つの増地を行った。

	例 5	例 6
αアミラーゼで滅菌した原料	6.30kg	7.25kg
グルコアミラーゼ	15.0ml	16.7ml
CaCO <sub>3</sub>	4.0kg	4.5kg

結果は表1に示す。

時間平 2-76592(5)

表 1 表  
D-乳酸

例	培養液		グルコ アラーゼ g/L	培 養 基		C.S.L. (%) g/L	魚たんぱく加水分解生成物 g/L	培 養 成 剤	生成した 乳酸 g/L	発酵時間 (h)	生産性 g/L/h
	グルコ コース g/L	魚たんぱく加水分解生成物 g/L		炭 酸 水 素 イ オン g/L	窒 素 イ オン g/L						
1			135	0.312		35	5.4	CaCO <sub>3</sub>	123.3	45	2.74
2	130					35	5.4	CaCO <sub>3</sub>	121	85	1.42
3		163				35	5.4	CaCO <sub>3</sub>	121.3	107	1.13
4			135			35	5.4	CaCO <sub>3</sub>	91.5	65	1.40
5			130	0.30		35	5.4	CaCO <sub>3</sub>	113	40	2.82
6			145	0.337		35	5.4	CaCO <sub>3</sub>	124.6	60	2.24

(1) グルコース含量 71%

(2) C.S.L.=トウモロコシ炭出液 (炭酸トウモロコシ洗浄水)

(15)

## 例 7 L-乳酸の製造

例 1 記載の条件で炭化したトウモロコシ粉 7 kg を含む懸濁液に、炭酸小苏打水 1,750 kg、魚たんぱく加水分解生成物 0,270 kg、りん酸 25 ml を加えた。この混合物を飲料水で 27 L に希釈して攪拌し、pH が 6.0 に調整し、蒸気を 1 時間次込んで滅菌した。

炭酸カルシウム 4.35 kg を含む滅菌水溶液 16 L を加え、温度を 40℃ に調整した。この培地にグルコアミラーゼ (登録商標 AMG 200L-MVVO Industry) を含む酵素調製物 16 L ml を加え、予め MRS 培地に接種した。Lactobacillus casei 170 2425 培養物 1.7 L を接種した。

発酵培地は最終的に 50 L とし、40℃ の滅菌した炭酸水溶液中で攪拌し、冷却した。

L-乳酸の含量は高速液体クロマトグラフィーで定期的に測定した。

発酵始成時間 (h)	20	40	60	80	107
L-乳酸濃度 (g/L)	21	47.5	66	98	120.2

(16)

## 例 8-11

容量 50 L の発酵槽に炭酸 6 kg を導入した。飲料水を攪拌しながら加えて蒸留させ、全液量を 27 L とした。

発酵槽最後の pH を H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で 6.5 に調整し、これに熱安定性 α-アミラーゼ (登録商標 THERMAL 120L-MVVO Industry) を含む酵素調製物 3.25 ml を加えた。

発酵槽内面は次に、蒸気を 30 分間次込んで 100℃ に加熱して滅菌した。

炭酸化した炭酸溶液を冷却し、トウモロコシ炭出液 1,750 kg、魚たんぱく加水分解生成物 0,270 kg、りん酸 25 ml を加えた。飲料水を加えて 38 L に調整し、NaOH で pH を 6.0 に調整した。

得られた培地に、蒸気を 1 時間次込んで 100℃ で滅菌した。この工程の最後に、40℃ に冷却し、休養は 5 L であった。

この培地に、グルコアミラーゼ (登録商標 200L-MVVO Industry) を含む酵素調製物 13 L ml を加え、MRS 培地中に適宜接種した Lactobacillus lactis

(17)

特開平 2-76592(5)

ATCC 12314の予備培養物1.7gを接種した。

この培養物を検形し、滅菌した底液容器内で40℃で熟成した。

造形造粒として $\text{NH}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{NaOH}$ または $\text{KOH}$ を例8~11にそれぞれ加えてpHを自動的に6.9に調整した。

ロー乳脂の含量を高速度液体クロマトグラフィーによって測定して、次の結果を得た。

加熱熟成時間 (h)	25	50	75	85	90
ロー乳脂濃度 (g/g)					
例8 ( $\text{NH}_4$ )	39	76	98	101.8	102.3
例9 ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )	35	71	91	93.5	94.5
例10 ( $\text{NaOH}$ )	30	68	87	89.9	
例11 ( $\text{KOH}$ )	31	71	86	93.2	

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は例1~4における加熱時間と乳脂濃度との関係を示すグラフである。

(18)

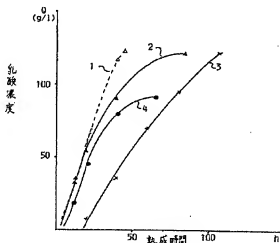


FIGURE 1